

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12P 7/64, C12M 1/00, C12N 1/12,</b> <b>C12R 1/89</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/15688</b> <b>(43) Date de publication internationale: 1er avril 1999 (01.04.99)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/01977 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 16 septembre 1998 (16.09.98) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/11678 19 septembre 1997 (19.09.97) FR <b>(71)(72) Déposants et inventeurs:</b> PHAM, Quoc, Kiet [FR/FR]; 38, passage des Ballades, F-95800 Cergy Saint Christophe (FR). DURAND-CHASTEL, Hubert [FR/FR]; 71, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR). <b>(74) Mandataires:</b> GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR MIXOTROPHIC CULTURE OF SPIRULINAS FOR PRODUCING A BIOMASS RICH IN $\omega$ 6 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND/OR IN SULPHOLIPIDS <b>(54) Titre:</b> PROCEDE DE CULTURE MIXOTROPHIQUE DE SPIRULINES POUR LA PRODUCTION D'UNE BIOMASSE RICHE EN ACIDES GRAS POLYINSATURES $\omega$ 6 ET/OU EN SULFOLIPIDES <b>(57) Abstract</b> The invention concerns a method for mixotrophic culture of spirulinas for producing a biomass rich in $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acids, in particular in $\gamma$ -linoleic acid, and/or in sulpholipids comprising at least a step of growing spirulinas in the presence of ammonium linoleate and optionally of glucose. <b>(57) Abrégé</b> L'invention concerne un procédé de culture mixotrophique de spirulines pour la production d'une biomasse riche en acides gras polyinsaturés $\omega$ 6, en particulier en acide $\gamma$ -linoléique, et/ou en sulfolipides comprenant au moins une étape de culture des spirulines en présence de linoléate d'ammonium et éventuellement de glucose.		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

Procédé de culture mixotrophique de spirulines pour la production d'une biomasse riche en acides gras polyinsaturés  $\omega$  6 et/ou en sulfolipides.

L'invention concerne un procédé de culture mixotrophique de spirulines pour la production d'une biomasse riche en composés biologiquement actifs, en particulier  
5 riche en acides gras polyinsaturés  $\omega$  6, en particulier en acide  $\gamma$ -linolénique, et/ou en sulfolipides.

Les spirulines ont été découvertes et sont utilisées comme complément alimentaire pour l'homme depuis plusieurs siècles. Ce sont des micro-algues bleues-vertes précieuses et rares ayant une valeur nutritionnelle particulière chez les enfants  
10 malnutris [1-5]. Elles se développent principalement dans les eaux sodées d'un certain nombre de lacs tropicaux, en zone aride. Elles sont riches en composés d'intérêt nutritionnel et biomédical : acides aminés indispensables, vitamines (A, B12, E), acides gras polyinsaturés essentiels (spécialement l'acide  $\gamma$ -linolénique) précurseurs des eïcosanoïdes (prostaglandines PGE1, PGE2 et thromboxanes TXB2  
15 etc.) chez les mammifères [6]. Les eïcosanoïdes (PGE2) et leucotriènes sont impliqués dans la réactivité immunitaire et la réaction inflammatoire. La prostaglandine PGE2 inhibe la prolifération des lymphocytes T4 qui interviennent dans la surveillance des cellules cancéreuses.

La présente invention concerne un procédé de culture de spirulines pour  
20 obtenir une biomasse riche en acide  $\gamma$ -linolénique et/ou en sulfolipide antiviral [7].

Les spirulines sont des algues bleues-vertes appartenant au *Phyllum Cyanophyta*, classe : *Cyanophyceae*, ordre : *Nostocales*, famille : *Oscillatoriaceae*, genre : *Spirulina* ou *Arthrospira*.

Il en existe différentes espèces, notamment les espèces *platensis* et *maxima*  
25 (Bourrelly P. 1970. Les algues bleues ou cyanophycées, dans « Les Algues d'eau douce », Tome III, Editions N. Boubée).

On a maintenant trouvé que des conditions de culture particulières, utilisant en tant que supplément le linoléate d'ammonium dans des conditions de température et d'éclairement optimisées, permettaient d'obtenir une biomasse de spirulines  
30 particulièrement riche en composés biologiquement actifs.

Les spirulines poussent assez bien dans les milieux de culture supplémentés en linoléate d'ammonium. Elles absorbent l'acide linoléique exogène sous forme de linoléate d'ammonium pour synthétiser l'acide  $\gamma$ -linolénique dans leurs lipides comme les monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), le digalactosyldiacylglycérol (DGDG), le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et le phosphatidylglycérol (PG).

L'invention concerne donc un procédé de culture mixotrophique de spirulines pour la production d'une biomasse riche en acides gras polyinsaturés  $\omega$  6, en particulier en acide  $\gamma$ -linolénique, et/ou en sulfolipides, caractérisé en ce que ladite production comprend au moins une étape de culture des spirulines en présence de linoléate d'ammonium.

La concentration de linoléate d'ammonium ajouté dans le milieu est comprise entre 30 et 90  $\mu\text{M/l}$ , de préférence de 35 à 75  $\mu\text{M/l}$ .

Avantageusement, l'étape de culture des spirulines en présence de linoléate d'ammonium est effectuée à une température comprise entre 20 et 35°C et sous un éclaircissement compris entre 50 et 125  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ , de préférence entre 75 et 100  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ , de préférence selon un cycle d'éclaircissement par 24 h d'environ 8 à 12 h de lumière blanche et environ 16 à 12 h dans l'obscurité.

Dans un aspect particulièrement préféré, le cycle d'éclaircissement est d'environ 12 h de lumière blanche et environ 12 h dans l'obscurité.

Le linéolate d'ammonium est avantageusement ajouté au milieu de culture durant la phase de croissance exponentielle, de préférence au milieu de cette phase, avantageusement lorsque la densité optique (D.O.) du milieu qui indique la concentration cellulaire est environ égale à 2.

De préférence, lorsqu'on effectue la production d'une biomasse de spirulines riche en acides gras polyinsaturés  $\omega$  6, en particulier en acide  $\gamma$ -linolénique, la température est comprise entre environ 24°C et 35°C, avantageusement environ 30°C et l'éclaircissement est de préférence compris entre 75 et 125  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ , avantageusement entre 75 et 100  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ , de préférence selon un cycle d'éclaircissement par 24 h d'environ 8 à 12 h de lumière blanche et environ 16 à 12 h dans l'obscurité.

Dans un aspect particulièrement préféré, le cycle d'éclaircissement est d'environ 12 h de lumière blanche et environ 12 h dans l'obscurité.

Lorsqu'on veut produire une biomasse de spirulines riche en sulfolipides, la température est de préférence comprise entre environ 20 et 25°C, et l'éclairement est de préférence compris entre 100 et 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , avantageusement selon un cycle d'éclairement par 24 h d'environ 8 à 12 h de lumière blanche et environ 16 à 12 h dans l'obscurité.

Dans un aspect particulièrement préféré, le cycle d'éclairement est d'environ 12 h de lumière blanche et environ 12 h dans l'obscurité.

Dans un aspect avantageux de l'invention, on peut également supplémenter le milieu en glucose, de préférence pendant la phase de croissance exponentielle, à une concentration de l'ordre de 2 à 5 g/l, de préférence 2,5 à 3 g/l.

Cette supplémentation peut avantageusement être effectuée à une température d'environ 30°C, sous éclairement d'environ 50 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  selon un cycle alterné par 24 h d'environ 8-12 h de lumière blanche et 16-12 h dans l'obscurité, de préférence 12 h de lumière blanche et 12 h dans l'obscurité.

La biomasse de spirulines peut être produite en bassin ou en photobioréacteur stérile. Les bassins et photobioréacteurs appropriés pour ce type de culture sont bien connus de l'homme du métier et décrits par plusieurs auteurs [12,13].

La production de biomasse de spirulines riche en acides gras polyinsaturés  $\omega$  6, en particulier en acide  $\gamma$ -linolénique et/ou en sulfolipides en bassin ou en photobioréacteur peut être réalisée en 3 étapes, à savoir :

- 1) la conservation des souches originales et la multiplication des souches (préparation des précultures pour l'ensemencement),
- 2) la production en masse, et
- 3) la récolte de la biomasse ainsi produite.

#### I - Souches de spirulines utilisées

Le procédé de culture selon l'invention s'applique à toutes les souches de spirulines sauvages (c'est-à-dire non mutantes) existantes, notamment à celles décrites dans les publications citées plus haut. La souche utilisée peut, par exemple, être choisie parmi les souches suivantes :

- *Spirulina platensis* PCC 8005 provenant de l'Institut Pasteur, Paris ;
- *Spirulina maxima* et *Spirulina texcoco* (Société Texcoco, Mexique) ;

– *Spirulina crater* (Laboratoire La Roquette, France).

La composition chimique générale de ces souches a été déterminée selon des méthodes d'analyse bien connues [8 – 12] et est présentée dans les tableaux 1, 2 et 3 ci-après.

5

Tableau 1 : Composition chimique générale ( % )

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
Protéines	56 – 61	59 – 60	60 – 61	58 – 60
Carbohydrates	16 – 19	18 – 19	13 – 14	12 – 14
Lipides	6,7 – 6,9	6,3 – 6,4	6 – 6,3	5 – 6
Sels minéraux	7 – 13	7,5 – 8	6 – 12	7 – 8
Humidité	7 – 8	7,7 – 8	6,8 – 7	7 – 8
Caroténoides	0,12 – 0,22	0,25 – 0,27	0,1 – 0,14	0,12 – 0,15
Chlorophylle a	0,7 – 0,8	0,77 – 0,80	0,7 – 0,76	0,7 – 0,78

Tableau 2 : Composition lipidique ( % )

10

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
MGDG	31,5 – 33	34,0 – 38,9	34 – 38	35 – 39
DGDG	15,7 – 17,3	15,0 – 17,8	14,0 – 17,5	16 – 18
PG	24,8 – 26,2	22,0 – 23,4	25,0 – 26,7	22,0 – 23,6
SQDG	24,8 – 26,6	22,3 – 23,7	24 – 26	22,0 – 24,5

Tableau 3 : Composition des acides gras totaux ( % )

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
A. palmitique (C16:0)	51,2	51,4	50,6	49,2
A. palmitoléique (C16:1)	3,6	5,0	4,3	2,1
A. stéarique (C18:0)	0,7	1,0	1,5	2,7
A. oléique (C18:1)	5,9	7,3	7,2	7,0
A. linoléique (C18:2)	18,2	14,6	15,0	18,5
A. $\gamma$ -linolénique ( $\gamma$ -C18:3)	20,4	20,7	21,4	20,5
$\Sigma$ C16/ $\Sigma$ C18	54,8 / 45,2	56,4 / 43,6	54,9 / 45,1	51,3 / 48,7

Dans le tableau 3 ci-dessus, les acides gras saturés et insaturés sont désignés de la manière suivante :

- C16:0 : acide palmitique (ou acide hexadécanoïque)
- 5    - C16:1 ( $\Delta^9$  cis C16:1) : acide palmitoléique (ou acide cis-9-hexadécénoïque)
- C18:0 : acide stéarique (ou octadécanoïque)
- C18:1 n-9 ( $\Delta^9$  cis C18:1) : acide oléique
- C18:2 n-6 ( $\Delta^{9,12}$  cis,cis C18:2) : acide linoléique (ou acide cis,cis-9,12-octadécadiénoïque)
- 10    - C18:3 n-6 ( $\Delta^{6,9,12}$  cis,cis,cis C18:3) : acide  $\gamma$ -linolénique (ou acide cis,cis,cis-6,9,12-octadécatriénoïque).

## II - Conservation des souches originales

La conservation des souches originales est réalisée à partir de souches dites « de garde », sélectionnées et conservées de la manière suivante :

- 15    a) Milieu Zarrouk liquide de culture aseptique ayant sensiblement la composition chimique citée dans le tableau 4 ci-après ;
- b) Température du milieu de culture d'environ 20 - 22°C ;
- c) Milieu de culture de réaction alcaline ou basique correspondant à un pH environ égal à 8,5 ;



d) Eclairage de la culture relativement faible (de l'ordre de 50 à 75  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ );

e) Eclairage dispensé pendant des plages d'environ 16 h alternant avec des plages d'obscurité d'environ 8 h par 24 h ;

5 f) Bouillon de précultures préliminaires maintenu en aération et turbulence générale par barbotage d'air stérile, enrichi en gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) à une teneur de 1 % en volume environ, au débit d'environ 20–30 litres d'air enrichi en  $\text{CO}_2$ / litre de culture / heure dans le cas de préparation d'inoculum pour la production en masse. Grâce à la lente croissance de la souche de garde dans le milieu Zarrouck liquide à 10 22°C, sous éclairage de 50 à 75  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , on peut repiquer régulièrement tous les 15–20 jours afin de toujours réserver une quantité suffisante de l'inoculum ;

g) Dans le cas de conservation des souches originales, on n'a pas besoin d'aération pendant 2–3 mois, à environ 22°C, sous l'éclairage de 50 à 75  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ;

15 h) Le pH du milieu Zarrouk est ajusté à 8,5 avant la stérilisation à 120°C pendant 20 min.

Tableau 4 : Composition chimique du milieu de Zarrouk (1966)

$\text{NaHCO}_3$	16,8 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5 g
$\text{NaNO}_3$	2,5 g
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{K}_2\text{SO}_4$	1,0 g
$\text{NaCl}$	1,0 g
$\text{CaCl}_2$	40 mg
$\text{FeSO}_4$	10 mg
EDTA	80 mg
Solution A5*	1 ml
Solution B6**	1 ml
$\text{H}_2\text{O}$	1 litre

\* 1 litre de solution A5 contient :

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	1,81 g
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	79 mg
MoO <sub>3</sub>	15 mg
(ou NaMoO <sub>4</sub> )	21 mg

\*\* 1 litre de solution B6 contient :

NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	23 mg
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> , 24H <sub>2</sub> O	96 mg
NiSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	48 mg
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	18 mg
Ti <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	40 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	44 mg

5 III – Production en masse

Dans la suite de la description, le nombre d'étapes ou de phases de préculture ou de culture, ainsi que leur durée, est indiqué à titre purement indicatif, étant donné qu'il peut bien sûr varier selon les conditions utilisées, notamment selon la concentration cellulaire initiale.

10 Pour la production mixotrophique de biomasse de spirulines riche en acides gras polyinsaturés  $\omega$  6, en particulier en acide  $\gamma$ -linolénique, et/ou en sulfolipides en bassin, la phase de préparation des précultures pour l'ensemencement, également appelée préparation de l'inoculum (multiplication des souches) peut par exemple être réalisée en 7 étapes successives qui sont détaillées dans la figure 1.

15 On notera que cette phase de préparation de l'inoculum n'est effectuée dans sa totalité qu'une seule fois au début du procédé de production. Pour préparer l'inoculum final, on peut ensuite réensemencer le milieu à un stade antérieur soit avec l'inoculum obtenu aux dernières étapes de préculture (6ème ou 7<sup>ème</sup> étape), soit avec

une partie des souches de spirulines obtenues en fin de production, ce qui représente un gain de temps et de faisabilité important à l'échelle industrielle.

Un paramètre important, indépendamment du nombre de phases, est la mesure de la concentration cellulaire, mesurée par la densité optique (D.O.) à 560 nm, qui permet une estimation du poids sec cellulaire.

La mesure de la D.O. permet de mesurer la concentration cellulaire initiale et d'optimiser les conditions de culture : en utilisant une concentration cellulaire initiale élevée, on peut diminuer la durée de culture tout en augmentant le rendement de production, ce qui est particulièrement avantageux pour une production à l'échelle industrielle.

Cette mesure permet également de définir le stade de croissance de la souche, et donc de déterminer le moment où le linoléate d'ammonium est ajouté dans le milieu de culture (la D.O. à ce moment est de l'ordre de 2).

La biomasse s'évalue à cette longueur d'onde située dans un creux du spectre d'absorption et qui ne correspond donc à aucun pigment particulier. L'absorbance à cette longueur d'onde, pour autant qu'elle ne dépasse pas une valeur de 2, varie de manière linéaire avec la concentration de culture. La courbe d'étalonnage montre que la D.O. à 560 nm, qui varie avec la concentration et les volumes cellulaires, est linéairement proportionnelle au poids sec cellulaire :  $D.O. = 1 \approx 0,7 \text{ g sec / l}$ .

Lorsque la multiplication initiale des souches (préparation des précultures) est réalisée en 7 étapes, il est possible, à partir de la 5<sup>ème</sup> étape, d'utiliser les milieux neufs stériles ZK dont les compositions sont données ci-après dans le tableau 5, à la place du milieu Zarrouk.

Les milieux ZK (1) à (4) sont des milieux de culture nouveaux particulièrement adaptés à la mise en oeuvre du procédé de culture des spirulines décrit ci-dessus, notamment à l'échelle industrielle, et représentent un objet ultérieur de l'invention. Le milieu ZK (1) est particulièrement préféré.

Tableau 5 : Composition chimique des milieux ZK (1) à (4)

ZK (1)		ZK (2)	
NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g	NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
NaCl	5,0 g	NaCl	4,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g	NaNO <sub>3</sub>	3,0 g
KNO <sub>3</sub>	2,5 g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g	FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
ou FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,018 g	H <sub>2</sub> O	1 litre
H <sub>2</sub> O	1 litre		

ZK (3)		ZK (4)	
NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g	NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
NaCl	5,5 g	NaCl	5,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO ou (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO ou (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2 g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
H <sub>2</sub> O	1 litre	FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
		H <sub>2</sub> O	1 litre

Des conditions de culture particulièrement avantageuses pour la production d'une biomasse de spirulines riche en acides gras polyinsaturés  $\omega$  6, en particulier en acide  $\gamma$ -linolénique et/ou en sulfolipides consistent à :

– faire barboter 60 à 80 l d'air enrichi à 1 % (en volume) CO<sub>2</sub>/l de milieu/h dans les précultures ;

– maintenir le pH du milieu de culture pendant la croissance entre 8,5 et 10,5, de préférence de 9 à 10, pour éviter les contaminations par d'autres microorganismes qui ne peuvent pas se développer dans un milieu très basique ;

– maintenir les concentrations minimales en ions bicarbonate, phosphate et nitrate, adaptées aux besoins de la souche de spiruline au cours de la croissance ;

– maintenir la température de culture à 30°C en assurant un éclaircissement de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  à raison d'environ 8 à 12 h de lumière et environ 12 à 16 h dans l'obscurité par 24 h pendant la croissance, puis abaisser l'éclaircissement à 75–100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  pendant la dernière phase de la production.

5 Dans un aspect avantageux, les concentrations en ions bicarbonate, phosphate et nitrate couvrant les besoins des souches de spirulines au cours de la croissance sont les suivantes :

- \* concentration de bicarbonate de sodium d'environ 8 à 10 g/l au début de la phase exponentielle de croissance et environ 0,8 à 0,9 g/l en phase stationnaire ;
- 10 \* concentration en hydrogénophosphate d'environ 0,2 g/l au début de la phase exponentielle et d'environ 0,02 g/l en phase stationnaire ;
- \* concentration en nitrate de sodium ou nitrate de potassium d'environ 2,5 g/l et celle de nitrate  $\text{NO}_3^-$  est d'environ 0,45 à 1 g/l ;

### III.1 – Production de biomasse en bassin

15 a) Production de biomasse riche en acide  $\gamma$ -linolénique

La production de biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique en bassin peut par exemple être réalisée en 5 phases successives dans chacune desquelles on effectue un repiquage d'une quantité donnée de culture de la phase précédente dans une quantité donnée de milieu neuf (milieu Zarrouk ou milieu ZK), à partir d'un  
20 inoculum préparé lors d'une phase préalable (phase 0).

La croissance est mesurée par la densité optique (D.O.) à 560 nm.

De manière avantageuse, on effectue une supplémentation de linoléate d'ammonium durant la phase de croissance exponentielle, par exemple au milieu de cette phase de croissance, sous éclaircissement de 75 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Cette phase est de préférence  
25 réalisée dans un nouveau bassin de 10  $\text{m}^3$  alors que les 4 premières ont eu lieu dans un premier bassin de 45  $\text{m}^3$ . Le bassin est de préférence équipé d'un système de circulation, par exemple une roue à aubes, pour assurer la circulation du milieu de culture. On utilise l'éclaircissement alterné d'environ 8–12 h de lumière blanche et environ 16–12 h dans l'obscurité par 24 h pendant 72 à 96 h, de préférence environ 12 h de lumière blanche et  
30 environ 12 h dans l'obscurité, en maintenant la température à environ 30°C, pour stimuler la synthèse d'acide  $\gamma$ -linolénique dans les cellules de spirulines. En outre, après la

supplémentation en linoléate, on abaisse le barbotage d'air enrichi à 1 % de CO<sub>2</sub>, si nécessaire pour le maintien du pH, et on le maintient au débit de 30–40 l/l de culture/h pendant 24 h pour éviter la formation de mousses, puis au débit plus fort de 50 à 70 l/l de culture / h.

5           b) Production de biomasse riche en sulfolipides

La production de biomasse de spirulines riche en sulfolipides en bassin peut, par exemple, être réalisée dans un bassin de 45 m<sup>3</sup> en 6 phases successives dont les 4 premières sont effectuées de la même manière que pour l'obtention de biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique. Lors de la phase de croissance exponentielle, 10 réalisée de préférence dans un second bassin de 12 m<sup>3</sup>, la culture est de préférence maintenue à environ 30°C sous éclairement de 75 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  pendant 48 h, puis à environ 24°C sous éclairement plus élevé de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  pendant 48 à 72 heures. Simultanément, le cycle d'éclairement par 24 h doit être de préférence réglé à 15 lumière blanche et 12 h dans l'obscurité, afin de stimuler la synthèse de sulfolipides dans les cellules de spirulines.

On maintient ensuite de préférence la culture à une température de 20 à 22°C, sous un éclairement de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , avec un cycle d'éclairement alterné d'environ 8–12 h de lumière blanche / environ 16–12 h dans l'obscurité pendant 72 à 96 h avant de 20 récolter la biomasse.

En outre, le barbotage d'air enrichi en 1 % de CO<sub>2</sub> est avantageusement abaissé et maintenu au débit de 25 l/l de culture / heure pendant 24–48 h, puis au débit plus fort de 40–60 l / l de culture / h pendant 48–96 h après la supplémentation en linoléate d'ammonium, si nécessaire pour le maintien du pH.

25           La supplémentation en linoléate d'ammonium est effectuée durant cette phase de croissance exponentielle, qui peut être par exemple la 5<sup>ème</sup> étape de la production.

La récolte de la biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique est effectuée à la fin de la phase de croissance exponentielle tandis que la récolte de la biomasse riche en sulfolipides est effectuée pendant la phase stationnaire. La D.O à ce 30 moment est de l'ordre de 3 à 4. On maintient de la biomasse dans les décanteurs à 24°C pendant 24 h pour éliminer le surnageant.

La récolte peut par exemple être effectuée de la manière suivante :

La biomasse précipitée au fond des décanteurs est filtrée ou soumise à une centrifugation à 5 000 tours / min pendant 15 min puis rincée avec une solution de NaCl à la concentration de 10 g / litre à 24°C afin d'éliminer une partie importante des sels résiduels et des traces de linoléate présents dans le milieu de culture. De plus, la teneur en sel de la solution de rinçage, similaire à celle du milieu de culture, permet d'éviter une rupture des membranes cellulaires due à la pression osmotique. Puis, on effectue une nouvelle centrifugation à 5 000 tours / min pendant 15 min et ensuite un rinçage à l'eau distillée ou déminéralisée (3 fois) à 20 – 24°C. La récolte de biomasse de spiruline est réalisée de préférence à une température comprise entre 20 et 24°C pour protéger la transformation d'acide linoléique en acide  $\gamma$ -linolénique. Cette basse température permet également d'éviter la dégradation cellulaire et la dénaturation lipidique.

La biomasse ainsi obtenue peut être lyophilisée ou atomisée, de préférence immédiatement afin d'éviter une contamination secondaire.

Le surnageant peut être recyclé pour une nouvelle culture (6<sup>ème</sup> phase) sous réserve de recontrôler les concentrations en bicarbonate, nitrate, phosphate, potassium, sodium, linoléate, etc... et de recompléter le milieu par les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des spirulines.

Ces besoins sont d'environ 470 g de carbone ; 120 g d'azote ; 13,3 g de potassium ; 7,6 g de phosphore ; 5,25 g de soufre ; 4 g de chlore ; 1,4 g de magnésium ; 1 g de calcium ; 0,47 g de fer et 0,3 g de sodium pour synthétiser 1 kg de biomasse. Selon ces besoins, on peut calculer les quantités des sels minéraux nécessaires afin de recompléter après la récolte d'une quantité connue de biomasse.

### III.2 – Production de biomasse en photobioréacteur

La biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique et/ou en sulfolipides peut alternativement être produite en photobioréacteur stérile.

Ce type de culture est particulièrement avantageux car il permet d'obtenir des biomasses de spirulines contenant une quantité encore plus importante d'acide  $\gamma$ -linolénique ou de sulfolipides que dans une culture en bassin. De plus, le contrôle des conditions de culture et la culture en système fermé permettent d'assurer une

grande pureté du produit fini, particulièrement adapté à une utilisation pharmaceutique ou cosmétique.

La préparation de l'inoculum (multiplication des souches de spiruline) peut par exemple être réalisée en 4 étapes successives dans chacune desquelles on effectue  
5 un repiquage d'une quantité donnée de la culture de l'étape précédente dans une quantité donnée de milieu neuf, de préférence le milieu Zarrouk.

On peut par exemple réaliser les 3 premières précultures en erlenmeyers de 50 ml, 250 ml et 1 l, et la 4<sup>ème</sup> préculture en photobioréacteur de 2 l. Des conditions de culture préférées sont détaillées ci-après dans les exemples.

10 a) Production de biomasse riche en acide  $\gamma$ -linolénique

Pour l'obtention de biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique, la production peut être par exemple réalisée en 2 phases, en photobioréacteur, de préférence dans 2 photobioréacteurs différents de 7 l.

La croissance cellulaire est également mesurée par la D.O à 560nm.

15 L'incorporation de linoléate d'ammonium est de préférence réalisée durant la phase de croissance exponentielle, à une concentration de 30 à 90  $\mu\text{M/l}$ , notamment de 35 à 75  $\mu\text{M/l}$ , de préférence pendant 4-6 jours.

La culture est ensuite réalisée préférentiellement dans les conditions suivantes :

- 20 – température d'environ 28°C à 32°C, de préférence 30°C ;  
– éclairage de 75 à 100  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$  selon un cycle par 24 h de 8 à 12 h de lumière blanche / 16 à 12 h dans l'obscurité après la supplémentation en linoléate d'ammonium ;  
– barbotage d'air enrichi à 1 % de  $\text{CO}_2$  avec un débit de 20 à 30 l/l de culture / h  
25 pendant 24 h après la supplémentation en linoléate d'ammonium puis avec un débit plus fort de 50 à 70 l/l de culture / h.

La vitesse d'agitation pendant la production est de préférence de 100 à 150 tours/min.

30 La récolte est effectuée après une durée de 4 à 6 jours de culture, dans les conditions indiquées ci-dessus pour la culture de spirulines en bassin.



b) Production de biomasse riche en sulfolipides

Pour l'obtention de biomasse de spirulines riche en sulfolipides en photobio-réacteur, la production peut, par exemple, être réalisée en 2 phases.

5 Au cours de la seconde phase, le milieu est supplémenté en linoléate d'ammonium dans les mêmes conditions que pour l'obtention d'une biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique.

Cette phase se déroule ensuite de préférence pendant 5 à 8 jours en 3 sous-phases successives dans les conditions suivantes :

- 1<sup>ère</sup> sous-phase :

- 10 . température de 28°C à 32°C, de préférence 30°C ;  
 . éclairement de 75 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  selon un cycle de 8 à 12 h de lumière blanche / 16 à 12 h dans l'obscurité par 24 h pendant 48 h ;  
 . barbotage d'air enrichi à 1 % de  $\text{CO}_2$  avec un débit de 25 l/l de culture/h pendant 24 à 48 h ;

15 - 2<sup>ème</sup> sous-phase :

- . température de 20 à 25°C, de préférence 24°C ;  
 . éclairement de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  selon le même cycle que dans la 1<sup>ère</sup> sous-phase ;  
 . barbotage d'air enrichi à 1 % de  $\text{CO}_2$  avec un débit de 40 à 50 l/l de culture/h pendant 48 à 72 h ;

- 3<sup>ème</sup> sous-phase :

- 20 . température de 20 à 22°C ;  
 . éclairement de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , selon le même cycle que dans la 1<sup>ère</sup> sous-phase pendant 72 - 96 h ;  
25 . barbotage d'air enrichi à 1 % de  $\text{CO}_2$  avec un débit de 40 à 60 l/l de culture/h pendant 72-96 h ;

La récolte de la biomasse de spirulines riche en sulfolipides est effectuée dans les conditions décrites plus haut.

30 Les procédés de culture décrits ci-dessus, en bassin ouvert ou en photobioréacteur stérile permettent d'obtenir des biomasses de spirulines

particulièrement riches en acide  $\gamma$ -linolénique et/ou en sulfolipides, qui constituent un objet ultérieur de l'invention.

Pour la biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique, la proportion d'acide  $\gamma$ -linolénique dans la biomasse par rapport aux acides gras totaux est d'au moins environ 25 %, notamment d'environ 29 à 35 % pour la culture en bassin et d'environ 30 à 36 % pour la culture en photobioréacteur, alors que dans un procédé classique, cette proportion est de l'ordre de 20 à 22 %.

Pour la biomasse de spirulines riche en sulfolipides, la proportion desdits sulfolipides par rapport aux lipides totaux est d'au moins environ 35 %, notamment d'environ 38 à 42 % pour la culture en bassin et d'environ 39 à 43 % pour la culture en photobioréacteur. Le pourcentage d'acide  $\gamma$ -linolénique est également en légère augmentation.

On observe également une augmentation de la teneur en lipides totaux dans les biomasses riches en acide  $\gamma$ -linolénique ou riches en sulfolipides produites.

Le procédé de culture des spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique selon l'invention peut avantageusement être utilisé pour produire une biomasse riche en cet acide gras sous forme d'un supplément alimentaire à haute valeur nutritive pour l'homme ou les animaux (par exemple poule pondeuse, crevettes, cerfs, chèvres). En outre, l'extraction de l'huile riche en acide  $\gamma$ -linolénique à partir de biomasse de spiruline peut être réalisée par des méthodes connues [14] pour fournir une catégorie d'huile alimentaire contenant de 75 à 85 % d'acide  $\gamma$ -linolénique. La purification d'acide  $\gamma$ -linolénique isolé à partir de cette huile peut efficacement être réalisée car elle ne contient que des teneurs faibles d'acides gras saturés et monoinsaturés. Le produit fini sous forme d'acide  $\gamma$ -linolénique naturel peut être utilisé dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

L'invention est illustrée par les exemples ci-après qui ne présentent aucun caractère limitatif. Les figures auxquelles il est fait référence dans les exemples sont les suivantes :

- figure 1 : schéma de la préparation des précultures (préparation de l'inoculum) de spirulines pour la production en masse ;

- figure 2 : schéma du procédé de production de biomasse de spirulines riches en acide  $\gamma$ -linolénique en bassin ;

– figure 3 : schéma du procédé de production de biomasse de spirulines riches en sulfolipides en bassin ;

– figure 4 : schéma de la production de biomasse de spirulines riches en acide  $\gamma$ -linolénique en photobioréacteur ;

5       – figure 5 : schéma de la production de biomasse de spirulines riches en sulfolipides en photobioréacteur.

### **EXEMPLE 1 – PRODUCTION D'UNE BIOMASSE DE SPIRULINES RICHES EN ACIDE $\gamma$ -LINOLENIQUE EN BASSIN**

#### **1. Préparation des souches originales et précultures pour la production en masse**

##### 10       1.1 Souches originales :

Les 5 souches suivantes de *Spirulina* ont été utilisées :

- *Spirulina platensis* PCC 8005 provenant de l'Institut Pasteur Paris ;
- *Spirulina maxima* et *Spirulina texcoco* (Société Texcoco, Mexique) ;
- *Spirulina crater* (Laboratoire La Roquette, France).

15       Elles ont été purifiées et conservées dans le milieu Zarrouk solide et liquide (Tableau 4), à 20–22°C et sous faible lumière alternée (50 à 75  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ), avec 16 h de lumière / 8 h dans l'obscurité.

##### 1.2 Précultures :

Des précultures en erlenmeyer de 1 et 5 litres sont préparées et repiquées tous  
20   les quinze jours. Le pH du milieu de Zarrouk est ajusté à 8,5 avant la stérilisation à 120°C pendant 20 min. Les précultures peuvent être commencées par la concentration cellulaire initiale mesurée par la densité optique de 0,3 à 0,5, mesurées à 560 nm sur un spectrophotomètre Varian DMS-90.

Ces précultures sont aérées grâce à un barbotage d'air qui permet également  
25   l'alimentation en  $\text{CO}_2$  avec un débit de mélange gazeux à 1 % de  $\text{CO}_2$  de 60–80 l/l de culture/h. En outre, les précultures en petit erlenmeyer (500 ml, 1 l, 2 l) peuvent aussi être réalisées dans un incubateur à  $\text{CO}_2$  Gallempkamp, avec une agitation orbitale 100 rotations par minute dans lequel est maintenue une atmosphère à 1 % de  $\text{CO}_2$ . Pour toutes les précultures, l'éclairage est de 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ .

30       L'inoculum préparé en erlenmeyer de 5 l sera utilisé pour la multiplication des souches avec des gaines plastiques de 150 l ou des bassins de 100 et 500 l pour

obtenir 1000 l de préculture, qui sont transférés vers le bassin de 45 m<sup>3</sup> afin de commencer la production en masse( voir figure 1).

## 2. Préparation du milieu de culture pour la production en bassin :

Toutes les précultures pour l'ensemencement ont été préparées avec le milieu de Zarrouk tandis que les cultures en masse à partir de 1 à 20 m<sup>3</sup> ont été réalisées avec le milieu neuf ZK (1) (Tableau 5). Le milieu Zarrouk (stérilisé à 120°C, pH ≈ 8,5 – 9 pendant 20 minutes et refroidi à 30°C) a été utilisé afin de préparer les précultures de spiruline (1<sup>ère</sup> à 4<sup>ème</sup> préculture). Pour les autres précultures (5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> précultures) et la production en masse, on peut utiliser le milieu neuf ZK (1) pour remplacer le milieu Zarrouk.

### 2.1 Stérilisation de l'eau usuelle pour la culture en masse.

L'eau usuelle peut être stérilisée par la méthode d'ultrafiltration avec un système de Millipore Filter ou par stérilisation avec l'hypochlorite de sodium : on ajoute à 140 litres d'eau usuelle 20 ml d'hypochlorite de sodium et on maintient à 25–30°C pendant 12–24 h. On ajoute 15,4 ml d'une solution de thiosulfate de sodium (350 g/litre). On peut éliminer la quantité de chlore en excès par un barbotage d'air stérilisé pendant 30–60 min.

On peut également utiliser de l'eau de mer en ajoutant à 140 litres d'eau de mer 40 ml d'hypochlorite de sodium.

### 2.2 Préparation de linoléate d'ammonium :

Le linoléate d'ammonium peut être synthétisé par les 2 méthodes suivantes :

#### (a) méthode 1 :

On ajoute 4 ml d'éther éthylique ammoniacal, préparé par barbotage d'ammoniac anhydre pendant 1 min dans un tube placé dans la glace contenant 10 ml d'éther éthylique, dans le tube contenant 0,5 g d'acide linoléique à sec. On évapore à sec avec de l'azote. On remet en solution dans du tampon dilué (par exemple du tampon tris-HCl 10 mM) ou dans de l'eau tamponnée à pH 8–9 avec de l'ammoniaque afin d'éviter leur dissociation. Après rinçage des parois, on ajoute l'eau tamponnée pour obtenir un volume final d'environ 50 ml.

#### (b) méthode 2 :

On ajoute à 0,5 g d'acide linoléique à sec 5,4 ml d'une solution d'ammoniaque 18 % et 4,6 ml d'eau bidistillée. On chauffe le mélange à 50–60°C pendant 30–45 min. On ajuste le pH à 8–9 avec de l'eau bidistillée après l'élimination de l'ammoniaque en excès avec de l'azote. Le volume final de la solution de linoléate d'ammonium est d'environ 50 ml. La concentration de cette solution de linoléate est d'environ 10 mg/ml.

La solution de linoléate est stérilisée par filtration sur filtre Millipore® 0,1 – 0,2 µm dans des conditions stériles. En outre, pour éliminer les mousses à la surface du milieu de culture, on a utilisé le silicone 426 R (à la concentration 1 mg/l, pH 6) en tant qu'antimousse.

### 3. Production en masse de spirulines riches en acide γ-linolénique en bassin (figure 2)

(a) Après la préparation de 1 m<sup>3</sup> d'inoculum (7<sup>ème</sup> préculture) avec la concentration cellulaire initiale (D.O à 560 nm ≈ 1–1,2), on a utilisé un bassin de 45 m<sup>3</sup> équipé d'une roue à aubes pour faire circuler le milieu de culture avec la vitesse de 10 à 20 cm/s ; d'un thermorégulateur pour maintenir la température à 30°C et régler la température de culture à 20–35°C selon le besoin du procédé de culture ; d'un système d'éclairage pour assurer l'illumination de la culture de 50 à 125 µE/m<sup>2</sup>/s et d'une pompe centrifugeuse pour alimenter de l'eau et récolter la culture de spiruline. La profondeur du milieu de culture peut être réglée à 20–40 cm. Le linoléate d'ammonium et le milieu neuf ZK (1) ont été préparés séparément à pH 8,5–9. Le bassin propre a été installé sous serre en plastique pour éviter la contamination en utilisant efficacement la lumière du soleil ;

(b) le procédé de production comprend les phases suivantes :

\* Phase 0 : on prépare 1 m<sup>3</sup> d'inoculum (7<sup>ème</sup> préculture) ayant une D.O. ≈ 1–1,2. On lave le bassin de 45 m<sup>3</sup> et on en vérifie la propreté avant l'ensemencement, puis on prépare 2 m<sup>3</sup> du milieu neuf ZK (1) et on ajuste le pH à 8,5–9.

\* Phase 1 : on ajoute à 2 m<sup>3</sup> du milieu neuf ZK (1) 1 m<sup>3</sup> d'inoculum ayant une D.O. ≈ 0,3–0,4. On règle et on maintient la température à 30°C et l'intensité lumineuse à 100 à 125 µE/m<sup>2</sup>/s. La vitesse de circulation du milieu de culture (V) est

maintenue à 10 cm/s. Après 72 h, on mesure la D.O.  $\approx 0,55-0,65$  pour connaître la vitesse de croissance de la spiruline.

\* Phase 2 : on ajoute à 3 m<sup>3</sup> de culture (de la phase 1) 2 m<sup>3</sup> du milieu neuf ZK (1). On maintient la culture à 30°C, 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , pH 9, V = 10 cm/s pendant 72 h. On mesure la D.O.  $\approx 0,76-0,9$  pour connaître la croissance de spiruline.

\* Phase 3 : on ajoute à 5 m<sup>3</sup> de culture (de la phase 2) 5 m<sup>3</sup> du milieu neuf ZK (1) et on maintient toutes les conditions de culture de la phase 2. Après 72 h, la D.O. mesurée est  $\approx 1,1-1,25$ .

\* Phase 4: on ajoute à 10 m<sup>3</sup> de culture (de la phase 3) 5 m<sup>3</sup> du milieu neuf ZK(1) et on maintient toutes les conditions de culture de la phase 3. Après 72-96 h, la D.O. mesurée est  $\approx 1,4-1,8$ .

\* Phase 5 : on extrait 4 m<sup>3</sup> de culture de la phase 4 et on transfère cette quantité vers de le second bassin de 12 m<sup>3</sup> pour continuer à cultiver en présence de linoléate d'ammonium (35-75  $\mu\text{M}$  linoléate/l). La D.O. mesurée est  $\approx 1,9-2,1$ . En même temps, on rajoute à 11 m<sup>3</sup> de culture dans le bassin principal 4 m<sup>3</sup> du milieu neuf ZK (1) pour préparer une autre culture en phase 4 en contrôlant simultanément le milieu et en le recomplétant en éléments nutritifs nécessaires à la croissance des spirulines.

On maintient la culture supplémentée en linoléate à 30°C, l'éclairement de 75-100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  et le pH 9-10 ; après 72-96 h, la D.O. mesurée est  $\approx 2,4-2,9$ .

#### (c) Conditions de culture

Les conditions de pH, température, éclairage, barbotage d'air enrichi à 1 % de CO<sub>2</sub> mentionnées plus haut dans la description doivent être maintenues.

Il y a également lieu de veiller à maintenir des concentrations en ions adaptées aux besoins de la spiruline au cours de la croissance, comme indiqué également plus haut.

#### (d) Récolte de la biomasse de spirulines

La culture de spirulines est maintenue dans les décanteurs à 24°C pendant 24 h pour éliminer le surnageant. La biomasse précipite au fond de décanteurs et est récoltée par la filtration ou la centrifugation à 5000 tours / min pendant 15 min et ensuite rincée avec une solution de NaCl à la concentration de 10 g / litre à 24°C. Puis

la biomasse est récoltée par une nouvelle centrifugation à 5000 tours / min pendant 15 min et ensuite rincée 3 fois avec de l'eau distillée ou déminéralisée à 20-24°C avant lyophilisation ou atomisation.

#### 4. Résultats

- 5 La composition chimique générale des spirulines cultivées selon le procédé de l'invention pour l'obtention de biomasses riches en acide  $\gamma$ -linolénique, leur composition lipidique et leur composition en acides gras totaux sont rapportées respectivement dans les tableaux 6, 7 et 8 ci-après.

10 Tableau 6 : Composition chimique générale des spirulines ( % ) cultivées en bassin pour obtenir les biomasses riches en acide  $\gamma$ -linolénique.

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
Protéines	55 - 60	54 - 59	53 - 58	56 - 58
Carbohyrates	15 - 18	13,5 - 15,0	10 - 12	11 - 13
Lipides	6,8 - 7,4	6,8 - 7,5	7,0 - 7,5	6,7 - 7,4
Sels minéraux	7,0 - 12,0	7,0 - 8,5	8 - 11	7,0 - 8,5
Humidité	7,0 - 8,0	7,0 - 8,0	7,0 - 8,0	7,0 - 8,0
Caroténoides	0,20 - 0,29	0,30 - 0,35	0,15 - 0,20	0,15 - 0,19
Chlorophylle a	0,7 - 0,8	0,67 - 0,72	0,70 - 0,78	0,7 - 0,8

15 Tableau 7 : Composition lipidique des spirulines ( % ) cultivées en bassin pour obtenir les biomasses riches en acide  $\gamma$ -linolénique

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
MGDG	46,1 - 47,5	44,8 - 46,8	45,0 - 46,3	42,8 - 44,5
DGDG	10,7 - 12,3	11,0 - 11,7	10,6 - 11,2	11,5 - 11,7
PG	19,0 - 20,4	18,9 - 19,5	18,8 - 19,6	19,5 - 20,1
SQDG	21,5 - 22,5	21,7 - 22,4	22,5 - 22,8	21,2 - 23,7

Tableau 8 : Composition des acides gras totaux ( % ) des spirulines cultivées en bassin pour obtenir les biomasses riches en acide  $\gamma$ -linoléinique

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
A. palmitique (C16:0)	30	35	34,5	36,6
A. palmitoléique (C16:1)	1,3	1,2	1,3	1,2
A. stéarique (C18:0)	1,4	1,4	1,4	1,4
A. oléique (C18:1)	3,7	4,8	4,7	4,5
A. linoléique (C18:2)	28,8	27,9	28,4	27,2
A. $\gamma$ -linoléinique ( $\gamma$ -C18:3)	34,8	29,7	29,7	29,1
$\Sigma$ C16 / $\Sigma$ C18	31,3 / 68,7	36,2 / 63,8	35,8 / 64,2	37,8 / 62,2

Les résultats montrent que :

- 5        – les biomasses produites contiennent de 6,7 à 7,5 % du poids sec sous forme de lipides, en augmentation par rapport aux souches originales. En outre, la teneur en caroténoïdes augmente et atteint de 0,15 à 0,35 % [tableau 6]. Les biomasses obtenues contiennent une quantité importante de MGDG atteignant de 42,8 à 47,5 % des lipides totaux [tableau 7] tandis que la proportion de SQDG n'est environ que de 21,2
- 10      – 23,7 % des lipides totaux. De plus, la teneur en acide  $\gamma$ -linoléinique dans ces biomasses augmente nettement et atteint de 29 à 34,8 % des acides gras totaux ;
  - l'accumulation d'acide  $\gamma$ -linoléinique est parallèlement accompagnée par l'augmentation d'acide linoléique dans ces biomasses [tableau 8], ce qui montre que l'acide linoléique exogène sous forme de linoléate d'ammonium a été absorbé et
- 15      désaturé par la  $\Delta^6$  désaturase pour former l'acide  $\gamma$ -linoléinique dans les cellules de spiruline ;
  - les pourcentages des acides gras totaux C16 dans les biomasses diminuent en fonction de l'augmentation des acides gras totaux C18 (31,3 / 68,7 chez *Spirulina* 8005).



## EXEMPLE 2 - PRODUCTION D'UNE BIOMASSE DE SPIRULINES RICHES EN SULFOLIPIDES EN BASSIN

1. La préparation des souches originales, les précultures et la préparation du milieu de cultures sont telles que décrites pour l'exemple 1.

5 2. Le procédé de production dont le schéma est représenté dans la figure 3, comprend les 6 étapes suivantes :

\* Phase 0 à phase 4 (dans le 1<sup>er</sup> bassin de 45 m<sup>3</sup>) : les spirulines sont cultivées comme décrit dans l'exemple 1. A la fin de la phase 4, on prend 4 m<sup>3</sup> de culture que l'on transfère vers le 2<sup>ème</sup> bassin et on rajoute à 11 m<sup>3</sup> de culture 4 m<sup>3</sup> du milieu neuf ZK (1) en contrôlant simultanément le milieu et en le recomplétant en éléments nutritifs nécessaires à la croissance des spirulines.

10 \* Phase 5 (dans le 2<sup>ème</sup> bassin de 12 m<sup>3</sup>) : on cultive 4 m<sup>3</sup> de spirulines supplémentées en linoléate d'ammonium à la concentration de linoléate de 35 – 75 µM / litre à 30°C / 48 h puis à 24°C pendant 48 h, sous éclaircissement de l'ordre de 75–125 µE/m<sup>2</sup>/s. Après 96 h de culture, ce volume de culture est transféré vers le 3<sup>ème</sup> bassin pour stimuler la synthèse de sulfolipides dans les cellules de spirulines. En même temps, on continue à prélever un nouveau volume de culture (4 m<sup>3</sup>) du 1<sup>er</sup> bassin afin de refaire une autre culture en présence de linoléate d'ammonium.

20 La concentration cellulaire atteint une D.O. à 560 nm ≈ 2,4 – 2,7 à la fin de la phase 5.

\* Phase 6 (dans le 3<sup>ème</sup> bassin de 12 m<sup>3</sup>) : on continue de cultiver les spirulines supplémentées en linoléate à 20 – 22°C sous éclaircissement de 100–125 µE/m<sup>2</sup>/s pendant 72 – 96 h avant de récolter la biomasse. La concentration cellulaire atteint une D.O. à 560 nm ≈ 2,5 – 2,8 à la fin de la phase 6.

25 La récolte est effectuée dans les conditions décrites dans l'exemple 1.

### 3. Résultats

La composition chimique générale des spirulines cultivées selon le procédé de l'invention pour l'obtention de biomasses riches en sulfolipides, leur composition lipidique et leur composition en acides gras totaux sont rapportées respectivement  
30 dans les tableaux 9, 10 et 11 ci-après.

Tableau 9 : Composition chimique générale ( % ) des spirulines cultivées en bassin pour obtenir les biomasses riches en sulfolipides.

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
Protéines	54 - 59	53 - 60	53 - 59	56,0 - 59,5
Carbohydrates	13 - 16	13,0 - 14,8	10,0 - 11,5	12,0 - 13,4
Lipides	6,7 - 7,2	6,6 - 7,2	6,8 - 7,1	6,9 - 7,0
Sels minéraux	7,0 - 10,8	7,3 - 8,2	8,0 - 11,0	7,4 - 8,5
Humidité	7,0 - 8,0	7,2 - 8,0	7,0 - 8,0	7,3 - 8,2
Caroténoides	0,16 - 0,24	0,28 - 0,32	0,12 - 0,17	0,13 - 0,18
Chlorophylle a	0,7 - 0,8	0,7 - 0,8	0,73 - 0,78	0,72 - 0,77

5 Tableau 10 : Composition lipidique ( % ) des spirulines cultivées en bassin pour obtenir les biomasses riches en sulfolipides

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
MGDG	34,0 - 34,8	34,5 - 35,6	37,0 - 38,4	36,9 - 38,1
DGDG	9,5 - 10,2	9,0 - 9,5	8,8 - 9,6	8,6 - 9,2
PG	12,9 - 13,4	14,0 - 14,6	12,0 - 12,8	13,6 - 14,0
SQDG	40,8 - 41,6	39,5 - 40,3	38,5 - 39,2	38,0 - 38,7

Tableau 11 : Composition des acides gras totaux ( % ) des spirulines cultivées en bassin pour obtenir les biomasses riches en sulfolipides

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
A. palmitique (C16:0)	40,2	41,0	41,5	41,1
A. palmitoléique (C16:1)	2,7	2,8	2,5	3,3
A. stéarique (C18:0)	3,0	3,3	3,2	3,8
A. oléique (C18:1)	3,4	3,8	4,9	4,7
A. linoléique (C18:2)	24,9	24,4	22,2	21,4
A.γ-linolénique (γ-C18:3)	25,8	25,1	25,7	25,7
ΣC16 / ΣC18	42,9 / 57,1	43,8 / 56,2	44 / 56	44,4 / 55,6

5 Les résultats montrent que :

– les spirulines contiennent environ de 6,6 à 7,2 % du poids sec sous forme de lipides, en augmentation par rapport aux souches originales [tableau 9] ;

– le pourcentage de MGDG diminue en fonction de l'augmentation de SQDG (ou sulfolipide). La proportion de sulfolipides augmente significativement dans toutes les souches utilisées et varie entre 38 et 41,6 % des lipides totaux tandis que le pourcentage de MGDG chez toutes les souches utilisées diminue et varie entre 34,0 et 38,4 % des lipides totaux [tableau 10]. Ces résultats prouvent que l'abaissement de la température (30°C → 24°C → 20°C) a stimulé la synthèse des sulfolipides ;

15 – la proportion d'acide γ-linolénique augmente légèrement de 20,4 à 25,8 % chez *Spirulina* 8005 ;

– le rapport des acides gras totaux C16 / des acides gras totaux C18 ne varie pas fortement et n'est que d'environ 42,9 / 57,1 chez *Spirulina* 8005 [Tableau 11].

Ces résultats montrent que les conditions de culture du procédé selon l'invention influencent significativement la proportion de sulfolipides dans la biomasse.

**EXEMPLE 3 – PROCÉDE DE CULTURE DE SPIRULINES RICHES EN ACIDE  $\gamma$ -  
5 LINOLENIQUE EN PHOTOBIOREACTEUR STERILE (FIGURE 4).**

**1. Multiplication des souches de spiruline :**

On a utilisé les mêmes souches que dans l'exemple 1.

Toutes les précultures de spirulines ont été préparées par les cultures en erlenmeyers (50 ml, 250 ml et 1 l) et en photobioréacteur de 2 l.

10 La préparation des précultures n'est effectuée qu'une seule fois au début de la production en masse.

La multiplication des souches est réalisée par les 4 étapes suivantes :

a) la première préculture (10 ml) est préparée par un erlenmeyer de 50 ml placé dans un incubateur Gallemkamp, à agitation orbitale de 100–120 rotations/min dans lequel est maintenue l'atmosphère à 1 % de CO<sub>2</sub>, sous l'éclairement de  
15 100  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/s. Le cycle d'éclairement est d'environ 12 h de lumière blanche/ 12 h dans l'obscurité pendant 5–7 jours à 30°C. La concentration cellulaire initiale est d'environ 0,2 – 0,35 g sec par litre de milieu Zarrouk (D.O.<sub>560</sub>  $\approx$  0,3 – 0,5) et la concentration cellulaire finale de la 1ère préculture atteint une D.O.<sub>560</sub>  $\approx$  1 – 1,2.

20 b) on utilise 10 ml de 1ère préculture comme inoculum pour faire la seconde préculture dans un erlenmeyer de 250 ml contenu 40 ml de milieu stérile Zarrouk, placé dans un incubateur Gallemkamp sous les conditions de culture utilisées pour la première préculture. Après 5–7 jours de culture, on obtient 50 ml de seconde préculture avec une D.O.<sub>560</sub>  $\approx$  1,2 – 1,3.

25 c) on ajoute à 200 ml de milieu stérile Zarrouk 50 ml de 2ème préculture pour commencer la troisième préculture. Cette préculture est réalisée dans un erlenmeyer d'un litre placé dans un incubateur sous les conditions de culture de la première préculture. Après 5–7 jours de culture, on obtient 50 ml de troisième préculture avec une D.O.<sub>560</sub>  $\approx$  1,2 – 1,3.

30 d) Pour faire la 4ème préculture, on prépare 1 l de milieu stérile Zarrouk dans un photobioréacteur stérile de 2 l. Puis on ajoute 250 ml de la 3<sup>ème</sup> préculture à ce

photobioréacteur placé sous les conditions de culture de la première préculture. Le barbotage d'air enrichi à 1 % de CO<sub>2</sub> est réglé au débit de 50–70 l / l de culture / h. Après 5–7 jours de culture, on peut obtenir 1 l de la 4<sup>ème</sup> préculture avec une D.O.<sub>560</sub> ≈ 1,2–1,4.

5    **2. Production d'une biomasse de spirulines riche en acide γ-linolénique en photobioréacteur (figure 4)**

.....  
a) on prépare 4 l de milieu stérile Zarrouk dans un photobioréacteur de 7 l en ajoutant 1 l de quatrième préculture comme l'inoculum préparé à l'étape 1.d). La culture est réalisée sous les mêmes conditions de culture que les précultures  
10    précédentes (D.O.<sub>560</sub> ≈ 1,4 – 2,0 après 5–7 jours de culture), avec une vitesse d'agitation d'environ 100 – 150 tours par minute. Le barbotage d'air enrichi à 1 % de CO<sub>2</sub> est réglé au débit de 50–70 l / l de culture / h.

b) on prélève 4 l de culture dans le premier photobioréacteur en recomplétant 4 l de milieu neuf stérile Zarrouk pour continuer à préparer la prochaine culture. Ensuite, on  
15    transfère stérilement 4 l de cette culture vers le second photobioréacteur de 7 l en supplémentant en linoléate d'ammonium (à une concentration de 35 – 75 μM linoléate / l) au milieu de la phase de croissance exponentielle pendant 4–6 jours. La culture est réalisée sous les conditions suivantes : à 30°C, sous un éclaircissement de 75 à 100 μE/m<sup>2</sup>/s, avec un cycle d'éclaircissement par 24 h de 8 – 12 h de lumière blanche / 16–12 h dans l'obscurité  
20    après la supplémentation de linoléate. Simultanément, le barbotage d'air enrichi en 1 % CO<sub>2</sub> est réglé au débit de 20–30 litres / l de culture / h après la supplémentation de linoléate et maintenu pendant 24 h pour éviter la formation des mousses à la surface du milieu de culture. On utilise le silicone 426R comme agent antimousse. La vitesse d'agitation est maintenue à environ 100 – 150 tours par minute. Puis le barbotage d'air  
25    enrichi à 1 % de CO<sub>2</sub> doit être augmenté et maintenu entre 50 et 70 l / l de culture / h.

c) après 4–6 jours de culture, on récolte la biomasse dans les conditions décrites dans l'exemple 1.

Dans cet exemple, la culture a été réalisée avec une concentration cellulaire plus élevée. Ceci a permis de diminuer la durée de la production en augmentant le  
30    rendement de culture (de 2,4 à 2,6 g sec par litre).

### 3. Résultats

Les spirulines cultivées en photobioréacteur selon le procédé de l'invention contiennent une quantité d'acide  $\gamma$ -linolénique plus importante que celles cultivées en bassin. La proportion d'acide  $\gamma$ -linolénique de la biomasse obtenue est d'environ 30-36 % des acides gras totaux (Tableaux 12 et 13). Le rendement de la culture en photobioréacteur est supérieur à celui de la culture en bassin et atteint 1,78 - 2,2 g sec par litre.

Tableau 12 : Composition lipidique ( % ) des spirulines cultivées en photobioréacteur pour obtenir les biomasses riches en  $\gamma$ -linolénique

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
MGDG	45,8 - 47,8	45,1 - 47,0	45,3 - 46,6	43,1 - 44,8
DGDG	11,0 - 11,5	11,3 - 11,8	11,0 - 11,5	11,6 - 11,8
PG	18,0 - 18,5	19,1 - 20,0	19,0 - 19,3	19,6 - 20,0
SQDG	21,4 - 22,2	20,7 - 21,2	22,4 - 22,6	21,0 - 23,4

Tableau 13 : Composition des acides gras totaux ( % ) des spirulines cultivées en photobioréacteur pour obtenir les biomasses riches en  $\gamma$ -linolénique

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
A. palmitique (C16:0)	29,7	34,3	34,0	36,0
A. palmitoléique (C16:1)	1,2	1,2	1,3	1,2
A. stéarique (C18:0)	1,3	1,4	1,4	1,3
A. oléique (C18:1)	3,5	4,6	4,5	4,2
A. linoléique (C18:2)	28,3	28,0	28,6	27,3
A. $\gamma$ -linolénique ( $\gamma$ -C18:3)	36,0	30,5	30,2	30,0
$\Sigma$ C16 / $\Sigma$ C18	30,9 / 69,1	35,5 / 64,5	35,3 / 64,7	37,2 / 62,8

**EXEMPLE 4 – PROCÉDE DE CULTURE DE SPIRULINES RICHES EN SULFOLIPIDES EN PHOTOBIOREACTEUR STERILE (FIGURE 5)**

**1. Production d'une biomasse de spiruline riche en sulfolipides en photobioréacteur**

5 On a utilisé les mêmes souches que dans l'exemple 1.

a) la multiplication de souche est réalisée par les 4 étapes indiquées à l'exemple 3.1. La préparation des précultures n'est effectuée qu'une seule fois au début de la production en masse.

10 b) la préparation de 5 l de culture dans le premier photobioréacteur de 7 l est réalisée par les étapes citées dans l'exemple 3, 2), a).

c) on prélève 4 l de culture du premier photobioréacteur en recomplétant 4 l de milieu neuf stérile Zarrouk dans ce photobioréacteur pour continuer à préparer une autre culture. Ensuite, on transfère stérilement 4 l de cette culture comme inoculum vers le second photobioréacteur de 7 l en supplémentant en linoléate d'ammonium (à  
15 une concentration de 35 – 75  $\mu\text{M}$  linoléate / l) pendant 5–7 jours, sous les conditions de culture suivantes :

c.1) la première étape comprend 2 phases successives :

– Phase 1 : la culture est maintenue à 30°C sous éclaircissement de 75 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , pendant 48 h. Simultanément, le cycle d'éclaircissement doit être réglé  
20 environ 8–12 h de lumière blanche / 16–12 h dans l'obscurité par 24 h. En outre, le barbotage d'air enrichi en 1 %  $\text{CO}_2$  doit être abaissé et maintenu au débit de 25–35 l / l de culture / h pendant 24 à 48 h. La vitesse d'agitation est maintenue à environ 100 – 150 tours par minute.

– Phase 2 : la culture est placée à 24°C, sous éclaircissement plus fort de 100 à  
25 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  pendant 48 h. Le cycle d'éclaircissement est d'environ 8–12 h de lumière blanche / 16–12 h dans l'obscurité par 24 h. Le barbotage d'air enrichi en 1 % de  $\text{CO}_2$  est augmenté et maintenu au débit plus fort de 40–50 l / l de culture / h pendant 48–72 h. La vitesse d'agitation est maintenue à environ 100–150 tours / minute.

c.2) dans la seconde étape, la température de culture est abaissée à 20–22°C,  
30 sous l'éclaircissement 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Le cycle d'éclaircissement est d'environ 12 h de lumière blanche / 12 h dans l'obscurité pendant 72 – 96 h avant de récolter la

biomasse. Le pH est d'environ 9-10,5 pour optimiser la synthèse de sulfolipide dans les cellules de spirulines. La culture est aérée par un mélange d'air enrichi en 1 % de CO<sub>2</sub> au débit de 50-60 l / l de culture / h. La vitesse d'agitation est maintenue à environ 100 - 150 tours / minute. La durée de la deuxième étape peut varier selon la souche cultivée.

d) la biomasse riche en sulfolipides est récoltée par le procédé de récolte indiqué dans l'exemple 1. Le schéma de la production de spirulines riches en sulfolipides en photobioréacteur est présenté dans la figure 5. L'augmentation de la concentration cellulaire initiale permet de réduire la durée de culture tout en augmentant le rendement de production (de 2,3 à 2,6 g sec / l).

## 2. Résultats

Les spirulines produites en photobioréacteur par le procédé selon l'invention contiennent une quantité importante de sulfolipides atteignant 39 - 43 % des lipides totaux (Tableaux 14 et 15). Le rendement de culture atteint de 1,65 à 2,1 g sec/l.

Tableau 14 : Composition lipidique ( % ) des spirulines cultivées en photobioréacteur pour obtenir les biomasses riches en sulfolipides

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
MGDG	33,8 - 34,9	34,0 - 35,2	36,8 - 37,3	36,5 - 37,4
DGDG	9,8 - 10,8	9,2 - 9,6	8,9 - 9,2	8,6 - 9,1
PG	11,0 - 11,3	13,0 - 14,0	12,4 - 12,8	12,6 - 13,0
SQDG	40,9 - 43,0	39,8 - 41,2	39,2 - 40,7	39,0 - 40,5



Tableau 15 : Composition des acides gras totaux ( % ) des spirulines cultivées en photobioréacteur pour obtenir les biomasses riches en sulfolipides

	Sp. 8005	Sp. maxima	Sp. texcoco	Sp. crater
A. palmitique (C16:0)	40,2	41,3	41,8	41,5
A. palmitoléique (C16:1)	2,7	2,6	2,4	3,1
A. stéarique (C18:0)	3,2	3,4	3,2	3,6
A. oléique (C18:1)	3,4	3,7	4,8	4,5
A. linoléique (C18:2)	24,6	23,7	22,0	21,7
A.γ-linolénique (γ-C18:3)	25,9	25,3	25,8	25,6
ΣC16/ΣC18	42,9 / 57,1	43,9 / 56,1	44,2 / 55,8	44,6 / 55,4

##### 5 EXEMPLE 5 : EFFET DE LA SUPPLEMENTATION ADDITIONNELLE EN GLUCOSE

*Spirulina platensis* PCC 8005 a été cultivée en photobioréacteur dans le milieu de Zarrouk supplémenté en linoléate d'ammonium ou en linoléate d'ammonium et en glucose.

La culture en photobioréacteur est réalisée avec les conditions suivantes :

- 10 - Les précultures en présence de glucose sont incubées dans l'obscurité sous agitation à 100 tours par minute pendant 10-14 jours à 30°C. On utilise des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu Zarrouk pour préparer ces précultures tandis que la culture mixotrophique est réalisée dans un photobioréacteur. La concentration cellulaire initiale (DO 560 nm) est d'environ 0,5 - 0,8.
- 15 - Puis, la culture en photobioréacteur est placée à 30°C sous éclaircissement continu de 50-100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  pendant 5 - 7 jours. Enfin, la culture est maintenue à 30°C sous éclaircissement de 50-100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  avec 8 - 12 h de lumière / 16 - 12 heures dans l'obscurité par 24 h pendant 5 - 7 jours.

- La récolte de biomasse est réalisée à la fin de la période d'obscurité.

Dans le cas de la supplémentation de glucose, le glucose exogène a été utilisé comme source de carbone pour synthétiser des substances organiques dans les cellules de spiruline. La concentration optimale de glucose pour la culture mixotrophique est d'environ 2,5 à 3 g/l. Le rendement de culture augmente en fonction de l'augmentation de glucose dans le milieu (de 0,5 à 2,5 g/l), puis le rendement de culture s'abaisse légèrement à une concentration de glucose exogène plus élevée (à partir de 5 g/l jusqu'à 10 g/l). Le rendement de culture atteint 2,5 - 2,7 g sec par litre.

Les résultats sont rapportés dans les tableaux 16, 17 et 18 ci-après.

La teneur en lipides est environ 7,7 - 9,2 % du poids sec dans le cas de la supplémentation simultanée en glucose et linoléate (tableau 16). Les cellules supplémentées soit en linoléate, soit en glucose et linoléate ont synthétisé significativement MGlcDG (monoglucosyldiacylglycérol), précurseur de MGDG et la proportion de MGlcDG atteint 10,2 - 12,2 % des lipides totaux (tableau 17).

En même temps, la synthèse d'acide  $\gamma$ -linolénique a été stimulée dans ces cellules et la teneur de cet acide gras atteint 35,8 % des acides gras totaux (tableau 18).

Tableau 16 : Composition chimique générale (%) de *Spirulina platensis* PCC 8005 cultivée dans le milieu Zarrouk supplémenté en linoléate (35,7  $\mu$ M/l) ou en glucose (2,5 g/l) & linoléate (35,7  $\mu$ M/l) à 30°

	+ <u>Linoléate</u>	+ <u>Glucose &amp; linoléate</u>
Protéines	55 - 60	57 - 62
Carbohydrates	15 - 18	15 - 19
Lipides	6,8 - 7,4	7,7 - 9,2
Sels minéraux	7,0 - 12,0	3,7 - 5,5
Humidité	7,0 - 8,0	6 - 7
Caroténoides	0,20 - 0,29	0,2 - 0,3
Chlorophylle a	0,7 - 0,8	0,68 - 0,76

Tableau 17 : Composition lipidique chez *Spirulina platensis* PCC 8005 cultivée dans le milieu Zarrouk supplémenté en linoléate (35,7  $\mu$ M/l) ou en glucose (2,5 g/l) & linoléate (35,7  $\mu$ M/l) à 30°

Conditions de culture	Lipides polaires (%)				
	MGlcDG	MGDG	DGDG	PG	SQDG
- Sans supplémentation	-	31,5-33	15,7-17,3	24,8-26,2	24,8-26,6
+ Linoléate	-	45,8-47,8	11,0-11,5	18,0-18,5	21,4-22,2
+ Glucose & linoléate	11,6-12,2	43,0-44,0	11,7-12,3	13,0-13,6	18,9-19,7

5 Tableau 18 : Composition des acides gras totaux chez *Spirulina platensis* PCC 8005 cultivée dans le milieu Zarrouk supplémenté en linoléate (35,7  $\mu$ M/l) ou en glucose (2,5 g/l) & linoléate (35,7  $\mu$ M/l) à 30°C

Conditions de culture	Acides gras totaux (%)						$\Sigma$ C16/ $\Sigma$ C18
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	$\gamma$ C18:3	
- Sans supplémentation	51,2	3,6	0,7	5,9	18,2	20,4	54,8/45,2
+ Linoléate	29,7	1,2	1,3	3,5	28,3	36,0	30,9/69,1
+ Glucose & linoléate	30,2	1,0	1,2	4,8	27,0	35,8	31,2/68,8

## REFERENCES

1. ANUSUYA DEVI M. et VENKATARAMAN L.V., 1983b. Supplementary values of the proteins of the blue green alga *Spirulina platensis* to rice and wheat proteins. Nutr. Rep. Intern. 28, 1029-1935.
2. BUCAILLE P., 1990. Intérêt et efficacité de l'algue *Spirulina* dans l'alimentation des enfants présentant une malnutrition protéino-énergétique en milieu tropical. Thèse de doctorat d'état en Médecine générale, Université de Toulouse.
3. QUIDSIA AKHTER S., 1991. A study on recovery from malnutrition and anaemia using *Spirulina*. Paper presented at the 1st seminar on "Use of Algae. A means to combat malnutrition." held at CESTI, Dhaka, on November 3rd, 1991.
4. NGUYEN Lan Dinh, 1995. "Evaluation du projet de lutte contre la malnutrition infantile" menée par le Centre de nutrition infantile de Hochiminh ville grâce à l'assistance du CESVI. Communication from Vietnam.
5. NGUYEN Lan Dinh, 1995. Steps of developing and researching *Spirulina* at Child nutrition center. Paper presented at the seminar on "Utilisation de l'algue spiruline en nutrition et en thérapeutique", held at Hochiminh city, Vietnam, on April 12th, 1995.
6. PHAM QUOC Kiet et PASCAUD Marc, 1996. Effects of dietary  $\gamma$ -linolenic acid on the tissue phospholipid fatty acid composition and the synthesis of eicosanoids in rats. Ann. Nutr. Metab. 40, 99-108.
7. GUSTAFSON K.R., CARDELLINA J.H., FULLER H.R.W., WEISLOW O.S., REBECCA F.K., SNADER K.M., PATTERSON G.M.L. et BOYD M.R., 1989. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (Blue-green algae). J. Nat. Cancer Inst., MD, Vol. 81, 16, 1254-1258.
8. BUSSON F., 1970. "*Spirulina platensis* (Gom.) Geitler et *Spirulina Geitleri* J. de Toni. Cyanophycées alimentaires". Service de santé, Parc du Pharo, 13 Marseille 7ème, 159p.
9. SOSA TEXCOCO, 1987. Communication from Sosa Texcoco, Mexique.
10. SCHREURS W.H.P., 1987. Results of analysis of samples of *Spirulina* from Burma. TNO-CIVO Institutes, Netherlands.

11. CYANOTECH, 1990. Communication from Cyanotech, Hawaiï, USA.
12. VONSHAK A. et RICHMOND A., 1988. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an overview. *Biomass* 15, 233-247.
13. CORNET J.F., 1989. Etude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur.
- 5 Thèse de doctorat de l'université de Paris-Sud, Orsay, France.
14. COHEN Z. et HEIMER Y.M., 1990, Production of polyunsaturated fatty acids (EPA, ARA, and GLA) by the microalgae *Porphyridium* and *Spirulina*. In *Microalgal Biotechnology*, Cambridge University Press, 243-273.

### REVENDICATIONS

1. Procédé de culture mixotrophique de spirulines pour la production d'une biomasse riche en acides gras polyinsaturés  $\omega$  6, en particulier en acide  $\gamma$ -linolénique, et/ou en sulfolipides, caractérisé en ce que ladite production comprend au moins une  
5 étape de culture des spirulines en présence de linoléate d'ammonium à une concentration comprise entre 30 et 90  $\mu\text{M/l}$ , de préférence de 35 à 75  $\mu\text{M/l}$  de milieu.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de culture des spirulines en présence de linoléate d'ammonium est effectuée à une température comprise entre 20 et 35°C et sous un éclairciment compris entre 50 et 125  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ , de  
10 préférence entre 75 et 100  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ .

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le linéolate d'ammonium est ajouté au milieu de culture durant la phase de croissance exponentielle, de préférence au milieu de cette phase.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour la  
15 production d'une biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique, caractérisé en ce que la température est comprise entre environ 24°C et 35°C, avantageusement environ 30°C et l'éclairciment est compris entre 75 et 125  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ , avantageusement entre 75 et 100  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ .

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour la  
20 production d'une biomasse de spirulines riche en sulfolipides, caractérisé en ce que la température est de préférence comprise entre environ 20 et 25°C, et l'éclairciment est compris entre 100 et 125  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ .

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on ajoute du glucose au milieu de culture, de préférence pendant la phase de  
25 croissance exponentielle, à une concentration de l'ordre de 2 à 5 g/l, de préférence de 2,5 à 3 g/l.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la supplémentation en glucose est effectuée à une température d'environ 30°C, sous éclairciment d'environ  
50-100  $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$ .

8. Procédé selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisé en ce que  
30 l'éclairciment est effectué selon un cycle alterné par 24 h d'environ 8-12 h de lumière

blanche et 16 à 12 h dans l'obscurité, de préférence 12 h de lumière blanche et 12 h dans l'obscurité.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la biomasse de spirulines est produite en bassin ou en photobioréacteur stérile.

5 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour la production en masse d'une biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique et/ou en sulfolipides caractérisé en ce que les conditions de culture comprennent les conditions suivantes :

10 – faire barboter 60 à 80 l d'air enrichi à 1 %  $\text{CO}_2$ /l de milieu/h dans les précultures ;

– maintenir le pH pendant la croissance du milieu de culture entre 8,5 et 10,5, de préférence de 9 à 10 ;

– maintenir les concentrations en ions bicarbonate, phosphate et nitrate, adaptées aux besoins de la souche de spiruline au cours de la croissance,

15 – maintenir la température de culture à 30°C en assurant un éclaircissement de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  à raison d'environ 8 à 12 h de lumière blanche et environ 16 à 12 h dans l'obscurité par 24 h pendant la croissance, de préférence à raison d'environ 12 h de lumière blanche et environ 12 h dans l'obscurité, puis abaisser l'éclaircissement à 75 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  pendant la dernière phase de la production de biomasse.

20 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour la production en bassin de biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique, caractérisé en ce que la production de ladite biomasse comprend une étape de supplémentation en linoléate sous éclaircissement de 75 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , selon un cycle d'éclaircissement alterné par 24 h d'environ 8 à 12 h de lumière blanche et environ 16 à  
25 12 h dans l'obscurité, de préférence à raison d'environ 12 h de lumière blanche et environ 12 h dans l'obscurité, en maintenant la température à environ 30°C et en abaissant si nécessaire le barbotage d'air enrichi à 1 % de  $\text{CO}_2$  à un débit de 30–40 l / l de culture / h pendant 24 h après ladite supplémentation.

30 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour la production en photobioréacteur stérile de biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -

linoléique, caractérisé en ce que, après l'incorporation de linoléate d'ammonium, la culture est réalisée dans les conditions suivantes :

a) température de 28°C à 32°C, de préférence environ 30°C ;

5 b) éclairage de 75 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  selon un cycle d'éclairage alterné par 24 h de 8 à 12 h de lumière blanche / 16 à 12 h dans l'obscurité, de préférence à raison d'environ 12 h de lumière blanche et environ 12 h dans l'obscurité, pendant 72 à 96 h ;

c) barbotage d'air enrichi à 1 % de  $\text{CO}_2$  avec un débit de 20 à 30 l/l de culture / h pendant 24 h après la supplémentation en linoléate d'ammonium.

10 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour la production en bassin de biomasse de spirulines riche en sulfolipides caractérisé en ce que la production de ladite biomasse comprend une étape de supplémentation de linoléate d'ammonium, sous éclairage de 75 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  à environ 30°C pendant 48 h, puis de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  à environ 24°C pendant 48 à 72 h selon un cycle d'éclairage alterné d'environ 8 à 12 h de lumière blanche et environ 16 à 12 h dans  
15 l'obscurité par 24 h, enfin, de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  à environ 20–22°C pendant 72 à 96 h selon un cycle d'éclairage alterné d'environ 8–12 h de lumière blanche et environ 16–12 h dans l'obscurité, éventuellement avec un barbotage d'air enrichi à 1 % de  $\text{CO}_2$  à un débit de 25 l / l de culture / h pendant 24–48 h après la supplémentation en linoléate d'ammonium, puis de 40–60 l / l de culture / h pendant 48 à 96 h.

20 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour la production en photobioréacteur stérile de biomasse de spirulines riche en sulfolipides, caractérisé en ce que la production de ladite biomasse comprend une étape de supplémentation de linoléate d'ammonium, sous éclairage de 75 à 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  à environ 30°C pendant 48 h, puis de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  à environ 24°C pendant 48 à  
25 72 h selon un cycle d'éclairage alterné d'environ 8 à 12 h de lumière blanche et environ 16 à 12 h dans l'obscurité par 24 h, enfin, de 100 à 125  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  à environ 20–22°C pendant 72 à 96 h selon un cycle d'éclairage alterné d'environ 8 à 12 h de lumière blanche et environ 16 à 12 h dans l'obscurité, éventuellement avec un barbotage d'air enrichi à 1 % de  $\text{CO}_2$  à un débit de 25 l / l de culture / h pendant  
30 24–48 h après la supplémentation en linoléate d'ammonium, puis de 40–60 l / l de culture / h pendant 48 à 96 h.



15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que la souche utilisée est choisie parmi *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*, *Spirulina crater* et *Spirulina texcoco*.

5 16. Biomasse de spirulines riche en acide  $\gamma$ -linolénique, caractérisée en ce que la proportion d'acide  $\gamma$ -linolénique dans la biomasse par rapport aux acides gras totaux est d'au moins environ 25 % et la teneur en lipides totaux dans la biomasse est augmentée.

17. Biomasse de spirulines riche en sulfolipides caractérisée en ce que la proportion desdits sulfolipides par rapport aux lipides totaux est d'au moins environ 35 %.

10 18. Biomasse de spirulines riche en sulfolipides selon la revendication 17, caractérisée en ce que la teneur en lipides totaux dans la biomasse est augmentée.

19. Milieu de culture pour la culture mixotrophique de spirulines, ayant l'une des compositions suivantes :

ZK (1)		ZK (2)	
NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g	NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
NaCl	5,0 g	NaCl	4,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g	NaNO <sub>3</sub>	3,0 g
KNO <sub>3</sub>	2,5 g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g	FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
ou FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,018 g	H <sub>2</sub> O	1 litre
H <sub>2</sub> O	1 litre		

ZK (3)		ZK (4)	
NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g	NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
NaCl	5,5 g	NaCl	5,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO ou (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO ou (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2 g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
H <sub>2</sub> O	1 litre	FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
		H <sub>2</sub> O	1 litre

Figure 1

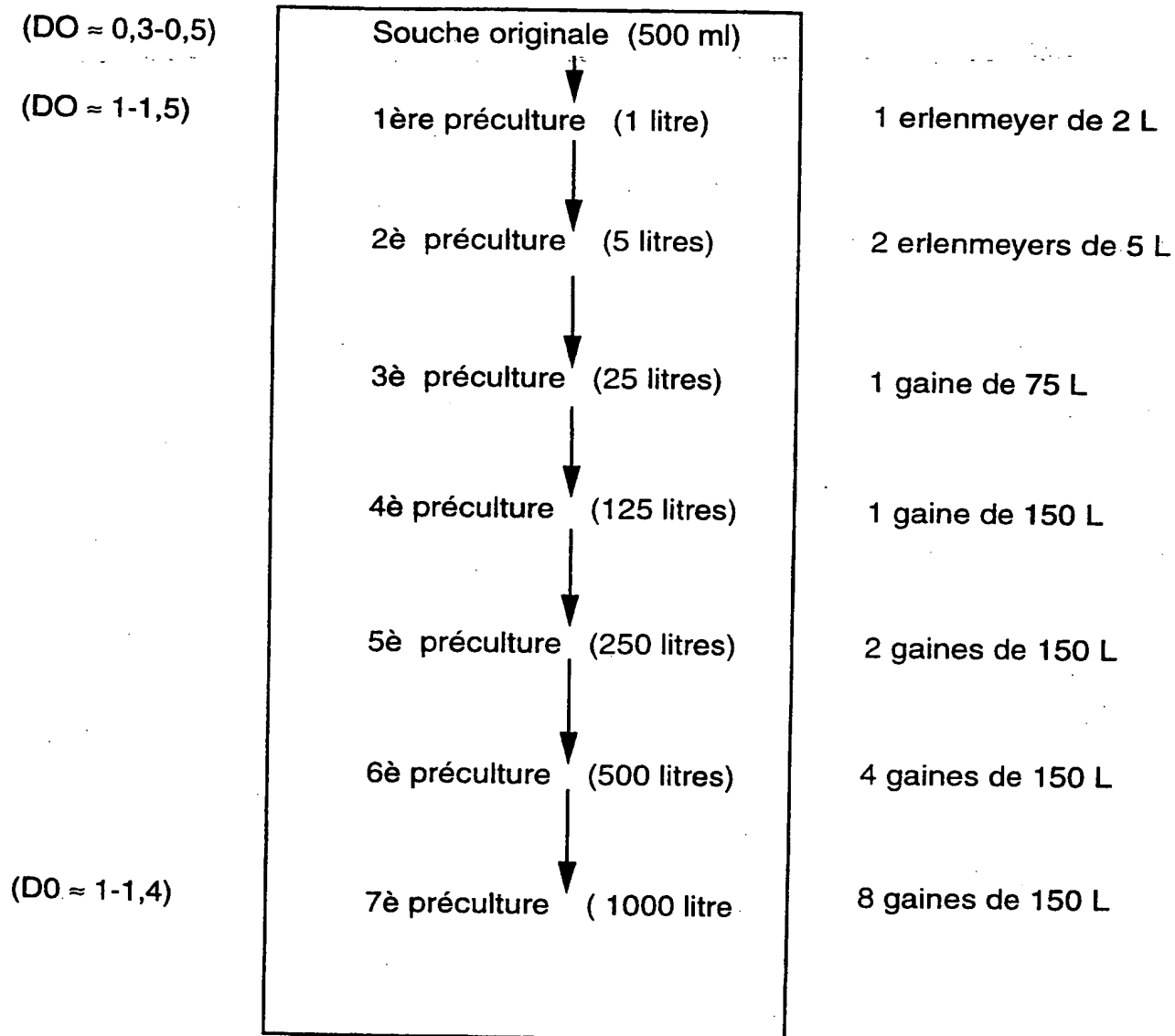




Figure 3

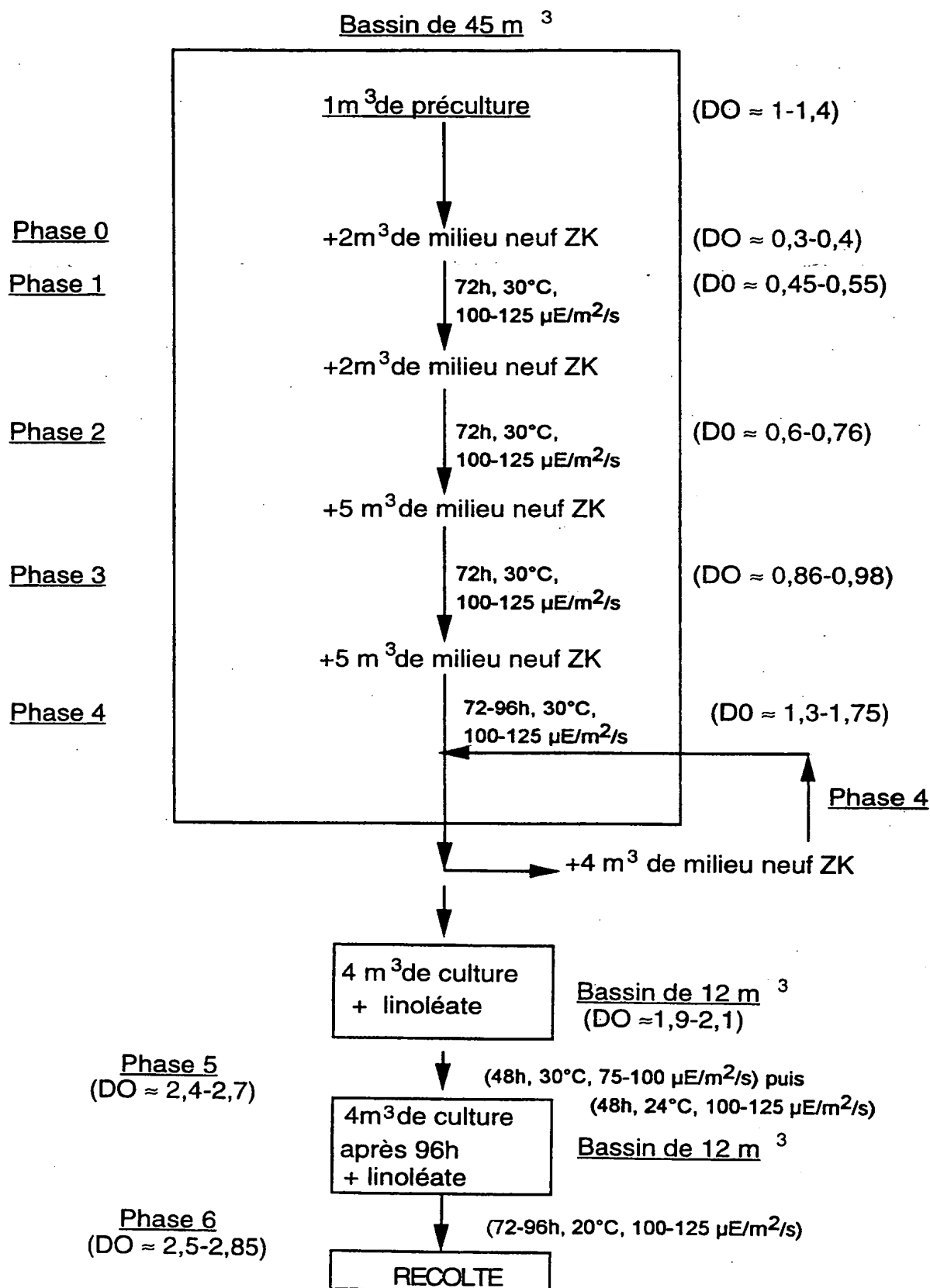


Figure 4

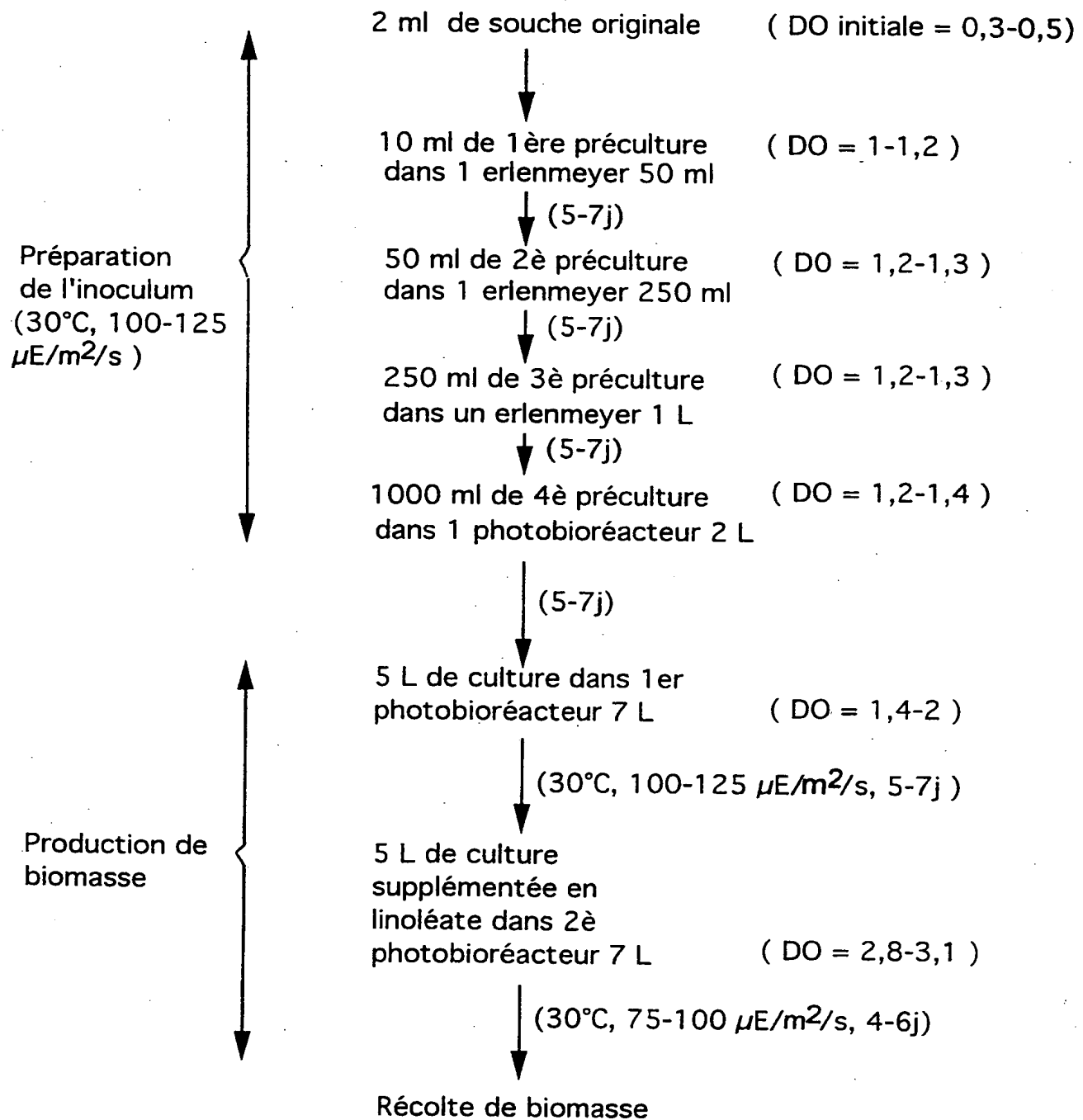
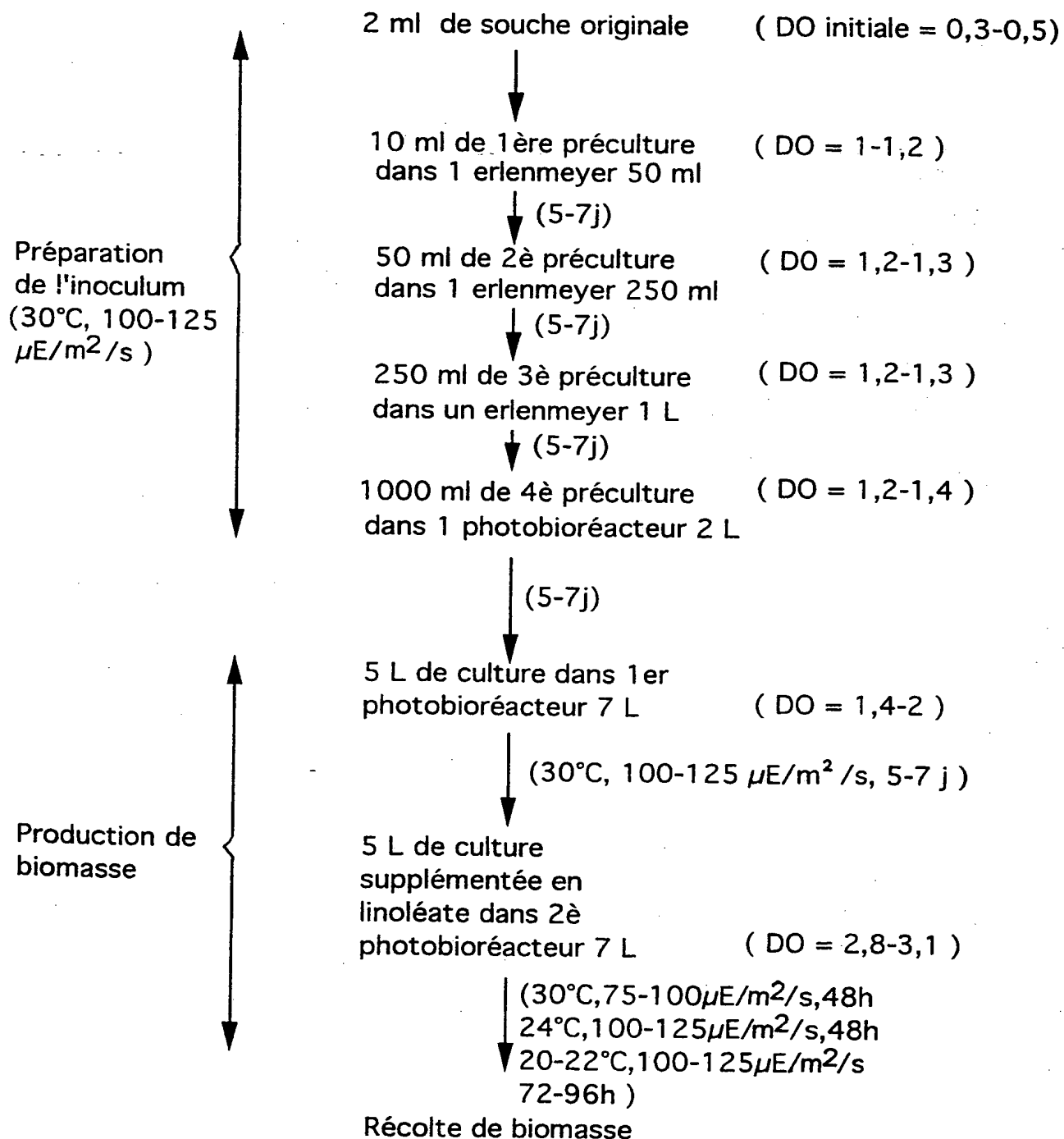


Figure 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01977

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12P7/64 C12M1/00 C12N1/12 C12R1/89

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C12M C12N A01G A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KIET PHAM QUOC ET AL: "Effect of growth temperature on the biosynthesis of eukaryotic lipid molecular species by the cyanobacterium <i>Spirulina platensis</i>" BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, vol. 1346, no. 3, 23 June 1997, pages 237-246, XP002055201</p> <p>* the whole document and particularly table 2</p> <p>page 240 and page 238 right column - page 240 *</p>	16
A		1-5, 9-15, 17-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

### Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 1998

Date of mailing of the international search report

15/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01977

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIET PHAM QUOC ET AL: "Comparative effects of exogenous fatty acid supplementations on the lipids from the cyanobacterium <i>Spirulina platensis</i> " PLANT PHYSIOLOGY BIOCHEMISTRY, vol. 32, no. 4, 1994, pages 501-509, XP002055202	16
A	see page 506; table 4 see page 504; table 2 see page 508 see page 505, right-hand column, paragraph 2	1-5, 9-15, 17-19
A	FRIDOR FUNTEU ET AL: "Effects of environmental factors on the lipid metabolism in <i>Spirulina platensis</i> " PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, vol. 35, no. 1, 1997, pages 63-71, XP002055242 see page 70 see page 65, left-hand column, paragraph 1	1,2,19
X	M. TANTICHAROEN ET AL: "Optimization of gamma-linolenic acid (GLA) production in <i>Spirulina platensis</i> " JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, vol. 6, 1994, pages 295-300, XP002055203 see page 297: tables 1-3	16
X	M. HIRANO ET AL: "Gamma-linolenic acid production by microalgae" APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 24/25, 1990, pages 183-191, XP002055204	16
A	see page 184 - page 186, last paragraph see page 186; table 1 see page 188, paragraph 3	19
A	ZHANG YIMING ET AL: "Effects of light intensity and glucose concentration on the growth of <i>spirulina platensis</i> " JOURNAL OF SOUTH CHINA UNIVERSITY, vol. 24, no. 2, February 1996, pages 141-145, XP002065948 see the whole document	1,6,7, 15,19
	-/--	



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No

PCT/FR 98/01977

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Z. COHEN ET AL: "Fatty acid composition of Spirulina strains grown under various environmental conditions" PHYTOCHEMISTRY, vol. 26, no. 8, 1987, pages 2255-2258, XP002055205 see the whole document ---	16
A	F. MARQUEZ ET AL: "Growth characteristics of Spirulina platensis in mixotrophic and heterotrophic conditions" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 76, no. 5, 1993, pages 408-410, XP002065949 see the whole document ---	1,4-7, 15,19
A	F. CHEN ET AL: "High cell density mixotrophic culture of Spirulina platensis on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system" ENZYME AND MICROBIAL TEHNOLOGY, vol. 20, no. 3, 15 February 1997, pages 221-224, XP002065950 see page 222 see page 224, right-hand column ---	1,4-7, 15,19
X	FR 1 496 066 A (INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE, DES CARBURANTS ET LUBRIFIANTS) 21 December 1967 see the whole document ---	19
A	FR 1 458 061 A (INSTITUT FRANCAIS DU PÉTROLE, DES CARBURANTS ET LUBRIFIANTS) 23 January 1967 see the whole document -----	19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01977

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family members)	Publication date
FR 1496066	A	21-12-1967	FR 90002 E	21-12-1967
			FR 1458061 A	23-01-1967
			OA 1878 A	04-02-1970
<hr/>				
FR 1458061	A	23-01-1967	FR 90002 E	21-12-1967
			FR 1496066 A	21-12-1967
			OA 1878 A	04-02-1970
<hr/>				

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. le Internationale No

PCT/FR 98/01977

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12P7/64 C12M1/00 C12N1/12 C12R1/89

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12P C12M C12N A01G A23L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>KIET PHAM QUOC ET AL: "Effect of growth temperature on the biosynthesis of eukaryotic lipid molecular species by the cyanobacterium Spirulina platensis" BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, vol. 1346, no. 3, 23 juin 1997, pages 237-246, XP002055201</p> <p>*le document en entier plus particulièrement le tableau 2 page 240 et page 238 colonne de droite - page 240*</p>	16
A	<p>---</p> <p>-/--</p>	1-5, 9-15, 17-19

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 décembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/12/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Cornec, N

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 98/01977

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KIET PHAM QUOC ET AL: "Comparative effects of exogenous fatty acid supplementations on the lipids from the cyanobacterium <i>Spirulina platensis</i> " PLANT PHYSIOLOGY BIOCHEMISTRY, vol. 32, no. 4, 1994, pages 501-509, XP002055202	16
A	voir page 506; tableau 4 voir page 504; tableau 2 voir page 508 voir page 505, colonne de droite, alinéa 2	1-5, 9-15, 17-19
A	FRIDOR FUNTEU ET AL: "Effects of environmental factors on the lipid metabolism in <i>Spirulina platensis</i> " PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, vol. 35, no. 1, 1997, pages 63-71, XP002055242 voir page 70 voir page 65, colonne de gauche, alinéa 1	1,2,19
X	M. TANTICHAROEN ET AL: "Optimization of gamma-linolenic acid (GLA) production in <i>Spirulina platensis</i> " JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, vol. 6, 1994, pages 295-300, XP002055203 voir page 297; tableaux 1-3	16
X	M. HIRANO ET AL: "Gamma-linolenic acid production by microalgae" APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 24/25, 1990, pages 183-191, XP002055204	16
A	voir page 184 - page 186, dernier alinéa voir page 186; tableau 1 voir page 188, alinéa 3	19
A	ZHANG YIMING ET AL: "Effects of light intensity and glucose concentration on the growth of <i>spirulina platensis</i> " JOURNAL OF SOUTH CHINA UNIVERSITY, vol. 24, no. 2, février 1996, pages 141-145, XP002065948 voir le document en entier	1,6,7, 15,19
X	Z. COHEN ET AL: "Fatty acid composition of <i>Spirulina</i> strains grown under various environmental conditions" PHYTOCHEMISTRY, vol. 26, no. 8, 1987, pages 2255-2258, XP002055205 voir le document en entier	16

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No  
PCT/FR 98/01977

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	F. MARQUEZ ET AL: "Growth characteristics of Spirulina platensis in mixotrophic and heterotrophic conditions" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 76, no. 5, 1993, pages 408-410, XP002065949 voir le document en entier ----	1,4-7, 15,19
A	F. CHEN ET AL: "High cell density mixotrophic culture of Spirulina platensis on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 20, no. 3, 15 février 1997, pages 221-224, XP002065950 voir page 222 voir page 224, colonne de droite ----	1,4-7, 15,19
X	FR 1 496 066 A (INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE, DES CARBURANTS ET LUBRIFIANTS) 21 décembre 1967 voir le document en entier ----	19
A	FR 1 458 061 A (INSTITUT FRANCAIS DU PÉTROLE, DES CARBURANTS ET LUBRIFIANTS) 23 janvier 1967 voir le document en entier -----	19

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der e Internationale No

PCT/FR 98/01977

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 1496066 A	21-12-1967	FR 90002 E	21-12-1967
		FR 1458061 A	23-01-1967
		OA 1878 A	04-02-1970
FR 1458061 A	23-01-1967	FR 90002 E	21-12-1967
		FR 1496066 A	21-12-1967
		OA 1878 A	04-02-1970